

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01460

JNK3 重组腺病毒促进表柔比星诱导的人成神经细胞瘤 SH-SY5Y 细胞凋亡

韩 卿¹, 宋方洲^{1*}, 易发平¹, 卜友泉¹, 王治东², 李长燕², 杨晓明^{2*}

1. 重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室, 重庆 400016
2. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850

[摘要] **目的:** 构建人 JNK3 基因重组腺病毒, 检测其对入成神经细胞瘤 SH-SY5Y 细胞增殖的影响; 以表柔比星作为凋亡诱导剂, 检测其对细胞凋亡的影响。 **方法:** 以 pDBLeu-JNK3 质粒为模板 PCR 扩增人 JNK3 基因全长, 构建重组穿梭载体 pAdTrack-CMV-JNK3, 线性化后与骨架载体 pAdEasy-1 在细菌 BJ5183 内同源重组, 在 HEK293 细胞中进行病毒包装和扩增, 经 PCR 方法鉴定后, 用包装后的病毒上清感染入成神经细胞瘤 SH-SY5Y 细胞, Western 印迹方法检测 JNK3 蛋白的表达; MTT 实验检测其对细胞增殖的影响; 流式细胞术和琼脂糖凝胶电泳检测表柔比星诱导的细胞凋亡情况。 **结果:** 核酸测序和 PCR 鉴定表明成功构建 Ad-JNK3, 终点稀释试验测定扩增的腺病毒滴度为 6.5×10^{10} pfu/ml; Ad-JNK3 在 SH-SY5Y 细胞中表达 JNK3 蛋白; MTT 检测结果表明 Ad-JNK3 可抑制 SH-SY5Y 细胞生长, 抑制率为 28.08%; 流式细胞术结果表明 Ad-JNK3 可明显促进表柔比星诱导的细胞凋亡, 琼脂糖凝胶电泳可观察到 DNA 梯形条带。 **结论:** 重组腺病毒 Ad-JNK3 能显著抑制 SH-SY5Y 细胞增殖, 促进表柔比星诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡, 为研究 JNK3 的作用机制及其用于入成神经细胞瘤的基因治疗提供了条件。

[关键词] JNK 丝裂原活化蛋白激酶类; 重组腺病毒; 表柔比星; 入成神经细胞瘤; 细胞凋亡

[中图分类号] R 739.4; R 73-36 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1460-06

JNK3 recombinant adenovirus promotes apoptosis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells induced by epirubicin

HAN Qing¹, SONG Fang-zhou^{1*}, YI Fa-ping¹, BU You-quan¹, WANG Zhi-dong², LI Chang-yan², YANG Xiao-ming^{2*}

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850

[ABSTRACT] **Objective:** To construct recombinant human JNK3 adenovirus and study its influence on the proliferation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, and to study its influence on epirubicin-induced apoptosis. **Methods:** The full-length JNK3 cDNA fragment was amplified by PCR from the pDBLeu-JNK3 plasmid to construct the shuttle plasmid AdTrack-CMV-JNK3. Then the linearized shuttle plasmid was co-transformed into BJ5183 bacteria with backbone vector pAdEasy-1 to obtain the recombinant adenoviral plasmid Ad-JNK3 by homologous recombination. The linearized recombined adenovirus Ad-JNK3 was then transfected into HEK293 cells for packing and amplification. Viral titers were measured by endpoint dilution assay. Ad-JNK3 was identified by PCR. The expression of Ad-JNK3 in SH-SY5Y cells was detected by Western blotting assay. The influence of Ad-JNK3 on the proliferation of SH-SY5Y cells was assayed by MTT after cells were infected by 100 pfu/ml adenovirus. The cell apoptosis induced by 0.5 μg/ml epirubicin was detected by flow cytometry method and agarose gel electrophoresis. **Results:** The recombinant adenoviral shutter vector AdTrack-CMV-JNK3 and recombinant adenoviral vector Ad-JNK3 were successfully constructed as identified by sequence analysis. PCR assay showed that adenovirus Ad-JNK3 contained JNK3 gene. After amplification in packing cell HEK293, 6.5×10^{10} pfu/ml titer of Ad-JNK3 was obtained. Western blotting assay showed that JNK3 protein was expressed in SH-SY5Y cells. After infected by 100 pfu/ml adenovirus, the proliferation of SH-SY5Y cells was inhibited by 28.08% with MTT method. Flow cytometry showed that Ad-JNK3 significantly promoted the apoptosis of SH-SY5Y cells induced by epirubicin. The DNA ladder of agarose gel electrophoresis was clearly seen. **Conclusion:**

[收稿日期] 2008-05-22 **[接受日期]** 2008-07-08

[基金项目] 国家自然科学基金(30671008), 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2007BA5012), 国家外专局项目(20075000019). Supported by National Natural Science Foundation of China(30671008), Natural Science Foundation Project of CQ CSTC(CSTC2007BA5012), and State Administration of Foreign Experts Affairs Foundation Project(20075000019).

[作者简介] 韩 卿, 博士生. E-mail: hqcq2008@163.com

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 023-68485991, E-mail: fzsongcq@163.com; E-mail: xmyang2@nic.bmi.ac.cn

Ad-JNK3 can obviously inhibit the growth of SH-SY5Y cells and promote apoptosis induced by epirubicin, which provides a solid foundation for further studies on the function of the JNK3 gene and applying it in gene therapy for human neuroblastoma.

[KEY WORDS] JNK mitogen-activated protein kinases; recombinant adenovirus; epirubicin; human neuroblastoma; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1460-1465]

c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNKs)为丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)超家族之一。在脊椎动物, JNK 由 *jnk1*、*jnk2*、*jnk3* 基因编码,表达的 JNK1、JNK2、JNK3 蛋白主要位于细胞质,为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。在成人脑中,这 3 种蛋白激酶的基因转录产物由于剪切方式的不同有 10 种亚型^[1]。JNK3 与 JNK1、JNK2 的不同在于:JNK3 有 1 个与位于 JNK1、JNK2 的 N 末端保守的甲硫氨酸残基融合在一起的延长的 N 末端区域^[1];JNK1、JNK2 在组织内广泛表达,而 JNK3 在脑、心脏、睾丸等组织特异表达。近年来研究^[2]发现 JNK3 参与神经细胞凋亡的调控,可促进缺血、缺氧、有毒化学物质导致的神经细胞凋亡。在多数脑瘤细胞内存在 JNK3 的缺失表达,提示 JNK3 是一个肿瘤抑制基因。由于 JNK3 在组织表达非常局限,我们利用 AdEasy 系统构建了 JNK3 载体复制缺陷性腺病毒 Ad-JNK3,检测其对成人神经细胞瘤 SH-SY5Y 细胞增殖的影响,以表柔比星作为凋亡诱导剂,检测其对细胞凋亡的影响,为研究 JNK3 的作用机制及其用于成人神经细胞瘤的基因治疗提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 穿梭质粒 pAdTrack-CMV,骨架质粒 pAdEasy-1,仅插入 GFP 的对照重组腺病毒质粒 pAd-GFP, pDBLeu-JNK3 质粒,大肠杆菌 BJ5183, DH5 α , HEK293 细胞,SH-SY5Y 人成神经细胞瘤细胞由本实验室保存。DMEM 为 Gibco 公司产品;胎牛血清为 Life Technologies 公司产品;PCR 及酶切产物纯化试剂盒、质粒 DNA 小量提取试剂盒购自 Promega 公司;DNA marker、DNA 限制性内切酶(*Xho* I, *Eco*RV)、pyrobest DNA polymerase、*rTaq* 酶等购自 TaKaRa 公司;DNA 限制性内切酶(*Pme* I, *Pac* I)、T4 DNA 连接酶、蛋白预染 marker 购自 New England Biolab 公司;转染试剂脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;PI 购自 Sigma 公司;JNK3 抗体购自 Upstate 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司;ECL 检测试剂购自 Pierce 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计与合成 根据 GenBank 登录的人 JNK3 基因序列(序列号为:NM_002753)设计引物,上

游引物为:5'-CCG CTC GAG ATG AGC CTC CAT TTC TTA TAC-3',下游引物为:5'-CCG GAT ATC TCA CTG CTG CAC CTG TGC-3',分别在上游引物和下游引物的 5'端加入 *Xho*I 和 *Eco*RV 酶切位点和 3 个保护碱基,引物由赛百盛公司合成。

1.3 人 JNK3 全长基因的获取 以 pDBLeu-JNK3 质粒为模板,采用 PCR 的方式扩增人 JNK3 基因,全长为 1 269 bp。PCR 50 μ l 反应体系中加 pDBLeu-JNK3 质粒模板 1 μ l, 10 \times PCR Buffer 5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP Mix 4 μ l, 10 μ mol/L 上下游引物各 2 μ l, pyrobest DNA polymerase 0.25 μ l, 加无菌水至 50 μ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定并胶回收纯化。

1.4 腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV-JNK3 的构建 将上述 PCR 产物和 pAdTrack-CMV 质粒分别用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco*RV 酶切后, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收纯化,经 T4 DNA 连接酶连接后转化 DH5 α 感受态,卡那霉素抗性筛选,选取阳性克隆进行菌落 PCR 和酶切鉴定,阳性克隆经测序分析后证实并命名为 pAdTrack-CMV-JNK3。

1.5 JNK3 重组腺病毒表达载体的构建 提取 pAdTrack-CMV-JNK3 质粒,用 *Pme* I 线性化,胶回收线性的 pAdTrack-CMV-JNK3 质粒,取 1 μ g 线性化质粒与 0.1 μ g 超螺旋 pAdEasy-1 质粒在 2.5 kV、200 Ω 、25 μ F 条件下电穿孔共转化 BJ5183 感受态细菌,立即于 37 $^{\circ}$ C 摇菌 1 h,涂卡那霉素抗性的 LB 固体培养板,于 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后挑取 15 个小菌落,小抽质粒并酶切鉴定,挑选出重组腺病毒质粒 pAd-JNK3,转化 DH5 α 大量扩增。

1.6 在 HEK293 细胞中制备 JNK3 重组腺病毒 *Pac* I 线性化 pAd-JNK3,乙醇、醋酸钠沉淀,700 ml/L 乙醇漂洗后溶解在 20 μ l 灭菌的去离子水中。配制 A 液(线性化 pAd-JNK3 质粒 4 μ g+250 μ l 无血清 DMEM)和 B 液(10 μ l Lipofectamine 2000+250 μ l 无血清 DMEM),A、B 混合,室温静置 20 min。转染前将 6 孔板内 HEK293 细胞换为无血清培养液,将混合物加在培养孔中轻轻混合,继续培养 6 h 后更换完全培养基,直至 90% 以上 HEK293 细胞出现病变(cytopathic effect, CPE)。收集上清继

续感染 HEK293 细胞以扩增病毒。将病毒粗提液进行对数稀释,通过终点稀释试验计算病毒滴度。终点稀释试验滴度计算公式:病毒滴度(pfu/ml) = $10^4(x+0.8)$, x 为各行阳性率总和。用氯化铯密度梯度离心法纯化重组腺病毒 Ad-JNK3,收集后的病毒层 0.22 μ m 无菌过滤后小份分装, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.7 PCR 方法鉴定 JNK3 重组腺病毒 收集病毒感染的 HEK293 细胞上清,提取重组腺病毒基因组 DNA,以 Ad-JNK3 基因组 DNA 为模板,用 JNK3 特异上下游引物进行 PCR 扩增,检测目的基因是否插入病毒基因组,同时以只表达 GFP 的 Ad-GFP 基因组 DNA 为模板作阴性对照。取等体积 PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.8 JNK3 重组腺病毒感染 SH-SY5Y 细胞的鉴定 用荧光显微镜观察 Ad-JNK3 和 Ad-GFP 感染 48 h 后的 SH-SY5Y 细胞,并用 RIPA 细胞裂解液分别裂解 Ad-JNK3 和 Ad-GFP 感染的 SH-SY5Y 细胞,4 $^{\circ}$ C, 11 255 \times g, 离心 10 min, 收集上清。用 Bradford 法进行蛋白定量后,取 50 μ g 处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜上,50 g/L 脱脂奶粉室温振荡封闭 2 h,与 1 : 2 000 稀释后的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,然后与 1 : 5 000 稀释后的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 显色系统检测目的蛋白。

1.9 JNK3 重组腺病毒对 SH-SY5Y 细胞增殖的抑制作用 将 SH-SY5Y 细胞铺 96 孔板(1×10^4 /孔),铺板后 24 h 内用无血清培养液稀释的滴度为 100 pfu/ml 的 Ad-JNK3 和 Ad-GFP 感染细胞,阴性细胞对照组只加无血清培养液,每组设 8 个平行孔,2 h 后,每孔加入 150 μ l 含 10% 血清的培养液,继续培养 72 h 后进行 MTT 测定,计算感染 Ad-JNK3 和 Ad-GFP 后细胞增殖的抑制率。细胞生长抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 } D_{570} \text{ 均值} / \text{对照组 } D_{570} \text{ 均值})] \times 100\%$ 。

1.10 JNK3 重组腺病毒促进表柔比星诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡 收集处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,以 5×10^5 /ml 的密度接种于 10-cm 细胞培养皿上。24 h 后的细胞融合度约为 40%~50%,换用无血清 DMEM 培养 24 h 使同步化。用无血清 DMEM 稀释的滴度为 100 pfu/ml 的 Ad-JNK3 和 Ad-GFP 感染细胞,6 h 后换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养,24 h 后加入终浓度为 0.5 μ g/ml 的表柔比星刺激 24 h, PBS 洗涤,加入 3 ml 乙醇混悬细胞,4 $^{\circ}$ C 放置 4 h。离心收集细胞, PBS 洗涤,用 500 μ l FACS 缓冲液(PBS、0.1% BSA、0.01% NaN_3)混悬细胞。加入 2.5 μ l RNase(10 mg/ml),室温放置

15 min,然后加入 25 μ l PI(1 mg/ml),室温避光放置 15 min,流式细胞仪上机分析。

JNK3 重组腺病毒感染和表柔比星处理 SH-SY5Y 细胞同上,分别用 PBS/Hanks 液洗涤 1 次,然后用 100 μ l TBE [(45 mmol/L Tris-boracic, 1 mmol/L EDTA), pH 8.0, 含 0.1% NP40, 临用时加 0.1% RNase]重悬,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,各加 5 μ l 的蛋白酶 K(20 mg/ml),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,在 1.5% 的琼脂糖凝胶上 80 V 电泳 1 h,紫外灯观察并摄像。

1.11 统计学处理 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 软件包处理,进行单因素方差分析及两两比较 *t* 检验, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 JNK3 全长的获取 以 pDBLeu-JNK3 质粒为模板,利用 JNK3 特异性的引物进行 PCR 扩增,产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,所得 PCR 片段约为 1 269 bp,与预期的人 JNK3 cDNA 全编码区的长度相符。

2.2 腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV-JNK3 的构建和鉴定 腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-JNK3 阳性克隆,经 *Xho* I 和 *Eco* R V 酶切后得到两条条带,1 条约为 1.3 kb 大小的目的条带,1 条为 8.9 kb 大小的空载体条带(图 1);根据 JNK3 基因序列设计特异引物进行测序,证实腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-JNK3 插入片段的序列与人 JNK3 的 cDNA 序列完全一致,表明腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-JNK3 构建成功。

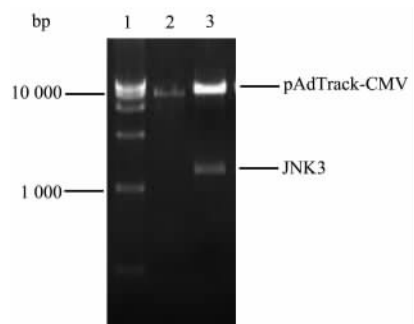


图 1 腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-JNK3 的酶切鉴定
Fig 1 Identification of shuttle plasmid pAdTrack-CMV-JNK3 by restriction digestion

1: DNA marker(DL 15 000); 2: pAdTrack-CMV was digested with *Xho* I/*Eco*RV; 3: pAdTrack-CMV-JNK3 was digested with *Xho* I/*Eco*RV

2.3 JNK3 重组腺病毒表达载体的构建和鉴定 重组腺病毒质粒 pAd-JNK3 阳性克隆经 *Pac* I 酶切后,可见 4.5 kb 和 23 kb 处各有 1 个条带(图 2)。

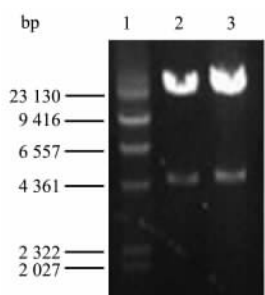


图 2 重组腺病毒表达载体的鉴定

Fig 2 Identification of recombinant adenovirus plasmids

1:DNA marker(λ -Hind III); 2:Ad-GFP/Pac I; 3:Ad-JNK3/Pac I

2.4 Ad-JNK3 重组腺病毒的包装 脂质体包裹线性化 Ad-JNK3 重组腺病毒表达质粒转染 293 细胞 1~2 d 后,光镜下可观察到空斑形成,细胞变圆、肿胀、脱壁、细胞核变大等病变。1 周后荧光显微镜下可见大约 40% 的绿色荧光。第 12 日,可见大部分包装细胞肿胀脱落,荧光显微镜观察视野满布绿色荧光(图 3),重组腺病毒构建成功。重组腺病毒滴度为 6.5×10^{10} pfu/ml。

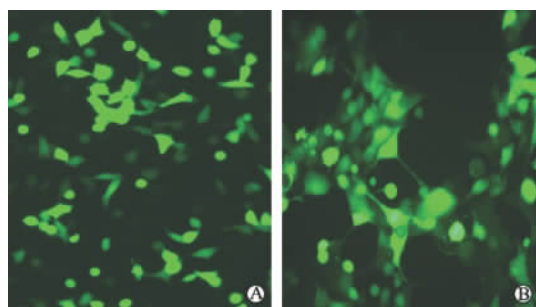


图 3 重组腺病毒在 293 细胞表达的绿色荧光蛋白

Fig 3 GFP expression in HEK293 cells

infected with recombinant adenovirus

A: Ad-GFP group; B: Ad-JNK3 group. Original magnification; $\times 400$

2.5 Ad-JNK3 重组腺病毒的 PCR 鉴定 以 Ad-JNK3 感染细胞提取的病毒上清为模板,PCR 扩增出特异性的约 1 300 bp 大小的片段,而感染 Ad-GFP 细胞的病毒上清中未扩增到该片段(图 4)。

2.6 Ad-JNK3 重组腺病毒在 SH-SY5Y 细胞中表达的鉴定 用 Ad-JNK3 感染 SH-SY5Y 细胞,24 h 后荧光显微镜观察显示 SH-SY5Y 细胞能被病毒感染,感染效率较高(图 5)。用抗 JNK3 单克隆抗体作 Western 印迹检测,结果在 Ad-JNK3 重组腺病毒感染的 SH-SY5Y 细胞中见相对分子质量约为 46 000 的蛋白条带,与预期值相符,而在 Ad-GFP 感染的 SH-SY5Y 细胞的相应位置无特异条带(图 6)。

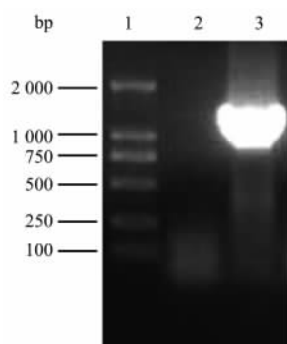


图 4 重组腺病毒 Ad-JNK3 的 PCR 鉴定

Fig 4 Identification of recombinant

adenovirus Ad-JNK3 by PCR

1:DNA marker(DL 2000); 2:Ad-GFP group; 3: Ad-JNK3 group

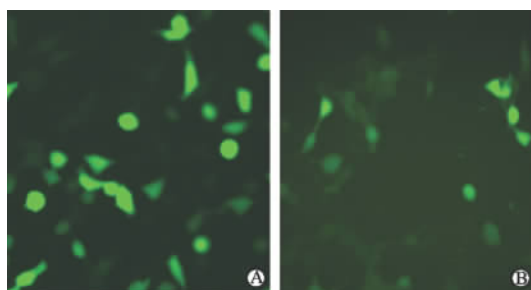


图 5 重组腺病毒在 SH-SY5Y 细胞表达的绿色荧光蛋白

Fig 5 GFP expression in SH-SY5Y cells

infected with recombinant adenovirus

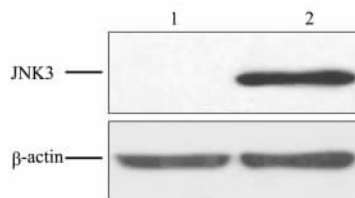
A: Ad-GFP group; B: Ad-JNK3 group. Original magnification; $\times 400$ 

图 6 Western 印迹鉴定 JNK3 在 SH-SY5Y 细胞中的表达

Fig 6 Expression of JNK3 protein in SH-SY5Y

cells detected by Western blotting

1: Ad-GFP group; 2: Ad-JNK3 group

2.7 Ad-JNK3 对 SH-SY5Y 细胞增殖的抑制作用 以无血清培养基处理细胞为对照,Ad-JNK3 对 SH-SY5Y 细胞增殖的抑制率为 28.08%, Ad-GFP 为 6.35%,若以 Ad-GFP 感染的细胞为对照,则 Ad-JNK3 对 SH-SY5Y 细胞的抑制率为 21.37%,表明滴度为 100 pfu/ml 的 Ad-JNK3 可显著抑制 SH-SY5Y 细胞增殖($P < 0.05$)。

2.8 流式细胞术检测细胞周期和凋亡 用滴度为 100 pfu/ml 的 Ad-GFP 和 Ad-JNK3 重组腺病毒感染 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,加入终浓度为 0.5 μ g/ml

的表柔比星刺激 24 h 流式细胞术检测细胞周期和凋亡。结果在 Ad-JNK3 感染细胞、表柔比星处理的 Ad-GFP 和 Ad-JNK3 感染细胞的 G₀/G₁ 期前可见凋亡峰(亚二倍体峰),凋亡细胞分别占 28.66%、

32.79%、60.59%。与 Ad-GFP 感染细胞相比,表柔比星能明显促进 Ad-JNK3 感染的 SH-SY5Y 细胞发生细胞凋亡($P < 0.05$),而 Ad-JNK3 对细胞周期的影响并不明显(表 1)。

表 1 JNK3 重组腺病毒对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

Tab 1 Effect of Ad-JNK3 on SH-SY5Y cell apoptosis

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	Apoptosis (%)
Ad-GFP	67.18±3.68	22.66±3.33	10.16±1.26	2.73
Ad-JNK3	61.13±2.56	29.14±3.47	9.37±1.45	28.66
Ad-GFP+epirubicin	60.76±3.23	30.52±3.78	8.72±0.76	32.79
Ad-JNK3+epirubicin	64.70±3.48	34.64±4.14	7.66±0.63	60.59*

* $P < 0.05$ vs Ad-JNK3 group

2.9 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡 从琼脂糖凝胶电泳结果中可以看出,在 Ad-JNK3 感染细胞、表柔比星处理的 Ad-GFP 和 Ad-JNK3 感染细胞组有较明显的梯状条带,而仅感染 Ad-GFP 细胞组则没有条带,与 Ad-GFP 感染细胞相比,Ad-JNK3 感染细胞组有更亮的 DNA 梯状条带,说明表柔比星能明显促进 Ad-JNK3 感染的 SH-SY5Y 细胞发生细胞凋亡(图 7)。

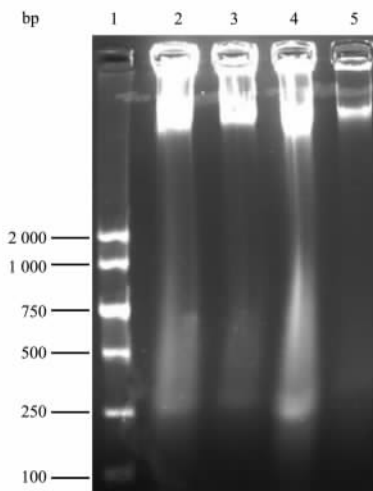


图 7 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测 Ad-JNK3 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响
Fig 7 Effect of Ad-JNK3 on apoptosis of SH-SY5Y cells by agarose gel electrophoresis

1:DNA marker(DL 2000); 2: Ad-GFP + epirubicin; 3: Ad-JNK3; 4: Ad-JNK3+epirubicin; 5: Ad-GFP

3 讨论

JNK 信号通路是 MAPK 中的重要通路之一。近年来研究^[3]发现 JNK3 在帕金森病、阿尔茨海默病、脑卒中等神经系统疾病中发挥重要作用。JNK3 与神经细胞凋亡密切相关。稳定转染 JNK3-p54 的 PC12 细

胞,能明显增强 UV 和紫杉醇诱导的细胞凋亡^[4]。JNK3 和 p38 促进亚硝酸钠诱导的皮质神经元凋亡^[5]。JNK3 信号通路通过活化神经酰胺合酶引发线粒体功能障碍,导致缺血再灌注后神经细胞的凋亡^[6]。JNK3 基因敲除小鼠可拮抗兴奋性毒性氨基酸诱导的海马区神经细胞凋亡^[7],减少局部脑缺血缺氧导致的神经细胞凋亡^[8-9]。在多数脑瘤细胞内存在 JNK3 的缺失表达,提示 JNK3 是一潜在肿瘤抑制基因。

复制缺陷型重组腺病毒(replication-deficient recombinant adenovirus)是目前基因治疗最常用的载体之一^[10]。腺病毒能感染分裂期和静止期靶细胞,致病性低,可高效价介导基因转移和表达,易纯化并可用于原位注射,病毒基因组不会整合至宿主细胞基因组中,致癌和致突变概率小,是较理想的基因转移载体^[11]。我们以人 JNK3 为目的基因,采用重组腺病毒载体系统成功构建了 Ad-JNK3,所获病毒滴度较高,序列测序和 PCR 鉴定结果表明重组腺病毒构建正确,用 Ad-JNK3 能高效感染 SH-SY5Y 细胞并抑制细胞增殖,100 pfu/ml 的 Ad-JNK3 对 SH-SY5Y 细胞增殖的抑制率为 21.37%;与感染 Ad-GFP 的 SH-SY5Y 细胞相比,明显增强表柔比星诱导的细胞凋亡($P < 0.05$),使细胞的凋亡率由 32.79%增至 60.59%,而且在 Ad-JNK3 感染细胞组有更明显的 DNA 梯状条带。本研究为成神经细胞瘤的基因治疗和化疗辅助治疗提供了新的思路 and 依据,也为我们下一步将 JNK3 基因表达载体直接注入瘤体内进行体内疗效研究奠定了实验基础。

[参考文献]

[1] Gupta S, Barrett T, Whitmarsh A J, Cavanagh J, Sluss H K, Dérijard B, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors[J]. EMBO J, 1996, 15:

- 2760-2770.
- [2] Yoshida S, Fukino K, Harada H, Nagai H, Imoto I, Inazawa J, et al. The c-Jun NH₂-terminal kinase 3 (JNK 3) gene: genomic structure, chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors[J]. *J Hum Genet*, 2001, 46: 182-187.
- [3] Resnick L, Fennell M. Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders[J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9: 932-939.
- [4] Waetzig V, Herdegen T. A single c-Jun N-terminal kinase isoform (JNK3-p54) is an effector in both neuronal differentiation and cell death[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 567-572.
- [5] Namgung U, Xia Z. Arsenic induces apoptosis in rat cerebellar neurons via activation of JNK3 and p38 MAP kinases[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 174: 130-138.
- [6] Yu J, Novgorodov S A, Chudakova D, Zhu H, Bielawska A, Bielawski J, et al. JNK3 signaling pathway activates ceramide synthase leading to mitochondrial dysfunction[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 25940-25949.
- [7] Yang D D, Kuan C Y, Whitmarsh A J, Rincón M, Zheng T S, Davis R J, et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene[J]. *Nature*, 1997, 389: 865-870.
- [8] Kuan C Y, Whitmarsh A J, Yang D D, Liao G, Schloemer A J, Dong C, et al. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 15184-15189.
- [9] Pirianov G, Brywe K G, Mallard C, Edwards A D, Flavell R A, Hagberg H, et al. Deletion of the c-Jun N-terminal kinase 3 gene protects neonatal mice against cerebral hypoxic-ischaemic injury[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27: 1022-1032.
- [10] He T C, Zhou S, da Costa L T, Yu J, Kinzler K W, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 2509-2514.
- [11] 赵国志, 郑少斌, 谭万龙, 刘 阳. 腺病毒介导胸苷激酶基因联合 α -IFN 治疗肾癌的实验研究[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 294-297.

[本文编辑] 尹 茶

• 读者 作者 编者 •

中草药名称中文、拉丁文及英文对照表(八)

汉语拼音名	中文名	拉丁名	英文名
Goushecao	狗舌草	<i>Herba Senecionis Kirilowi</i>	Kirilow Groundsel Herb
Goushen	狗肾	<i>Testis et Penis Canis</i>	Dog's Testis and Penis
Gouteng	钩藤	<i>Ramulus Uncariae cum Uncis</i>	Gambir Plant
Gouweicao	狗尾草	<i>Herba Setariae Viridis</i>	Green Bristlegrass Herb
Gualou	瓜蒌	<i>Fructus Trichosanthis</i>	Snakegourd Fruit
Gualouren	瓜蒌仁	<i>Semen Trichosanthis</i>	Snakegourd Seed
Guanbaifu	关白附	<i>Radix Aconiti Coreani</i>	Korean Monkshood Root
Guangdongtuniuxi	广东土牛膝	<i>Radix Eupatorii Chinensis</i>	Chinese Eupatorium Root
Guangdongwannianqing	广东万年青	<i>Herba Aglaonematis</i>	Chinagreen Herb
Guangfangji	广防己	<i>Radix Aristolochiae Fangchi</i>	Fangchi Root
Guanghuoxiang	广藿香	<i>Herba Pogostemonis</i>	Cablin Potchouli Herb
Guangjinqiancao	广金钱草	<i>Herba Desmodii Styracifolii</i>	Snowbell-leaf Tickclover Herb
Guangzao	广枣	<i>Fructus Choerospondiatis</i>	Axillary Choerospondias Fruit
Guanmutong	关木通	<i>Caulis Aristolochiae Manchuriensis</i>	Manshurian Dutchmanspipe Stem
Guanyejinsitao	贯叶金丝桃	<i>Herba Hyperici Perforati</i>	Common St. John'swort Herb
Guanzhong	贯众	<i>Rhizoma Cyrtomii</i>	Cyrtomium Rhizome
Guazijin	瓜子金	<i>Herba Polygalae Japonicae</i>	Japanese Milkwort Herb
Guihua	桂花	<i>Flos Osmanthi Fragrantis</i>	Sweet Osmanthus Flower
Guijia	龟甲	<i>Carapax et Plastrum Testudinis</i>	Tortoise Shell
Guijianyu	鬼箭羽	<i>Ramulus Euonymi</i>	Winged Euonymus Twig
Guizhencao	鬼针草	<i>Herba Bidentis Bipinnatae / Herba Bidentis Pilosae</i>	Spanishneedles Herb / Railway Beggarticks Herb
Guizhi	桂枝	<i>Ramulus Cinnamomi</i>	Cassia Twig
Gujingcao	谷精草	<i>Flos Eriocauli</i>	Buerger Pipewort Flower
Gukeye	古柯叶	<i>Folium Cocoe</i>	Coca Leaf
Guojianglong	过江龙	<i>Caulis Entadae</i>	Entadae Stem
Guotanlong	过坛龙	<i>Herba Adianti Flabellulati</i>	Flabellate Maiden-hair Herb
Gushanlong	古山龙	<i>Caulis Arcangelisiae</i>	Mountain Dragon
Gusuobu	骨碎补	<i>Rhizoma Drynariae</i>	Fortune's Drynaria Rhizome
Guya	谷芽	<i>Fructus Oryzae Germinatus</i>	Rice-grain Sprout
Haifengteng	海风藤	<i>Caulis Piperis Kadsurae</i>	Kadsura Pepper Stem
Haijinsha	海金沙	<i>Spora Lygodii</i>	Japanese Climbing Fern Spore
Hailong	海龙	<i>Syngnathus</i>	Pipe fish
Haima	海马	<i>Hippocampus</i>	Sea Horse
Haipaoxiao	海螵蛸	<i>Os Sepiae</i>	Cuttlebone
Haiyu	海芋	<i>Rhizoma Alocasiae Macrorrhizae</i>	Common Alocasia Rhizome
Haizao	海藻	<i>Sargassum</i>	Seaweed
Hamayou	蛤蟆油	<i>Oviductus Ranae</i>	Forest Frog's Oviduct